

Роль молекулярно-генетических изменений в прогнозе эффективности адъювантной внутрипузырной терапии немышечно-инвазивного рака мочевого пузыря

Д.С. Михайленко^{1–3}, С.А. Сергиенко¹, И.Н. Заборский⁴, К.Н. Сафиуллин⁴, С.А. Серебряный¹,
Н.Ю. Сафронова¹, М.В. Немцова^{2, 3}, А.Д. Каприн¹, Б.Я. Алексеев¹

¹Научно-исследовательский институт урологии и интервенционной радиологии им. Н.А. Лопаткина – филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава России; Россия, 105425 Москва, ул. 3-я Парковая, 51, стр. 1;

²ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет); Россия, 119991 Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2;

³ФГБНУ «Медико-генетический научный центр»; Россия, 115522 Москва, ул. Москворечье, 1;

⁴Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава России; Россия, 249031 Обнинск, ул. Маршала Жукова, 10

Контакты: Дмитрий Сергеевич Михайленко dimserg@mail.ru

Рак мочевого пузыря (РМП) в 75 % случаев представлен немышечно-инвазивными формами на стадии Ta, T1, CIS. При немышечно-инвазивном РМП (НМРМП) «золотым стандартом» лечения является трансуретральная резекция мочевого пузыря, однако ее проведение далеко не всегда позволяет избавить пациента от рецидива заболевания. В связи с этим пациентам с низким риском прогрессирования после трансуретральной резекции назначают внутрипузырную химиотерапию, с высоким риском (T1G2/3) – инстилляции вакциной БЦЖ (бацилла Кальметта–Герена). Остается актуальным вопрос о поиске маркеров для лабораторной диагностики, которые помогли бы заблаговременно определить чувствительность или резистентность к планируемому виду адъювантной терапии НМРМП. В настоящей работе рассмотрены опубликованные преимущественно в последние 5–7 лет данные о генетических предикторах ответа на адъювантную химиотерапию и, в большей мере, иммунотерапию вакциной БЦЖ. Систематизированы подтвержденные в метаанализах сочетания аллелей в генах иммунного ответа, детоксикации ксенобиотиков и других локусах, которые ассоциированы с ответом на адъювантную терапию НМРМП. Отдельно рассмотрены экспрессионные профили на уровнях матричных РНК, микро-РНК и белков, панели метилированных локусов, ассоциированные с эффективностью химио- и иммунотерапии НМРМП. Показано, что определение соматических мутаций в первичной опухоли и общей мутационной нагрузки с помощью технологий высокопроизводительного секвенирования (NGS) также позволило выявить ряд потенциальных прогностических маркеров. Возможно, после стандартизации анализа мутационной нагрузки он будет шире использоваться как высокоинформативный предиктор иммунотерапии РМП: БЦЖ-терапии НМРМП и схем лечения РМП с назначением таргетных ингибиторов иммунных контрольных точек. Обзор ориентирован на онкологов, генетиков, молекулярных биологов, урологов, патоморфологов и других специалистов, работающих в области молекулярной генетики онкоурологических заболеваний.

Ключевые слова: рак мочевого пузыря, микросателлитная нестабильность, генетический полиморфизм, мутационная нагрузка, БЦЖ-терапия, соматическая мутация, иммунотерапия, экспрессия генов

Для цитирования: Михайленко Д.С., Сергиенко С.А., Заборский И.Н. и др. Роль молекулярно-генетических изменений в прогнозе эффективности адъювантной внутрипузырной терапии немышечно-инвазивного рака мочевого пузыря. Онкоурология 2018;14(4):124–38.

DOI: 10.17650/1726-9776-2018-14-4-124-138

The role of molecular genetic alterations in sensitivity of the adjuvant intravesical therapy for non-muscle invasive bladder cancer

D.S. Mikhaylenko^{1–3}, S.A. Sergienko¹, I.N. Zaborsky⁴, K.N. Safiullin⁴, S.A. Serebryany¹,
N.Yu. Safronova¹, M.V. Nemtsova^{2, 3}, A.D. Kaprin¹, B.Ya. Alekseev¹

¹N.A. Lopatkin Research Institute of Urology and Interventional Radiology – branch of the National Medical Research Radiological Center, Ministry of Health of Russia; Build. 1, 51 3rd Parkovaya St., Moscow 105425, Russia;

²Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia; Build. 2, 8 Trubetskaya St., Moscow 119991, Russia;

³Research Centre for Medical Genetics; 1 Moskvorechye St., Moscow 115522, Russia;

⁴A. Tsyb Medical Radiological Research Center – branch of the National Medical Research Radiological Center, Ministry of Health of Russia; 10 Marshala Zhukova St., Obninsk 249031, Russia

Bladder cancer (BC) is represented by non-muscle-invasive forms at the stage Ta, T1, CIS (NMIBC) in 75 % of cases. The gold standard of treatment of NMIBC patients is transurethral resection, but its implementation does not always allow the patient to be relieved of the recurrence

of the disease. In this regard, patients with a low risk of progression after transurethral resection are administered by intravesical chemotherapy, with high risk (TIG2/3) – using instillation with BCG (Bacillus Calmette–Guerin) vaccine. Searching of NMBC markers for laboratory diagnostics, which would help to determine sensitivity or resistance to the planned type of adjuvant therapy remains an actual problem. The data published mainly in the last 5–7 years about genetic predictors of the response to adjuvant chemotherapy and, to a greater extent, immunotherapy with BCG vaccine, are reviewed in this work. Allele combinations in the genes involved in immune response, xenobiotic biotransformation and other loci that are associated with the response to the adjuvant NMBC therapy in meta-analyses are systematized. Also, expression profiles of mRNA, microRNA and proteins, as well as panels of methylated loci associated with the effectiveness of chemotherapy and immunotherapy of NMBC are considered. It was demonstrated that the somatic mutations sequencing in the primary tumor and the total mutational load using high-throughput sequencing technologies (NGS) identified a number of potential prognostic markers. Perhaps, the mutational load will be more widely used as a highly informative predictor of immunotherapeutic effect in BC: BCG therapy of NMBC and BC targeted therapy using the inhibitors of immune control points, after the standardization of the analysis. This review is intended to oncologists, geneticists, molecular biologists, urologists, pathologists and other specialists working in the field of molecular genetics in oncological urology.

Key words: bladder cancer, microsatellite instability, genetic polymorphism, mutational load, BCG therapy, somatic mutation, immunotherapy, gene expression

For citation: Mikhaylenko D.S., Sergienko S.A., Zaborsky I.N. et al. The role of molecular genetic alterations in sensitivity of the adjuvant intravesical therapy for non-muscle invasive bladder cancer. *Onkourologiya = Cancer Urology* 2018;14(4):124–38.

Введение

Рак мочевого пузыря (РМП) по распространенности занимает 13-е место среди всех онкологических заболеваний и 9-е место среди онкологических заболеваний у мужчин в России, представляя собой актуальную проблему в современной онкоурологии [1]. По количеству смертельных исходов от онкологических заболеваний РМП находится на 17-м месте в мире [2]. В 75 % случаев выявляют немышечно-инвазивный РМП (НМРМП) на стадии T_a, T₁, CIS по TNM-классификации, в оставшихся 25 % случаев – мышечно-инвазивный РМП (МИРМП) на стадии T₂ и выше, а также распространенные формы заболевания с метастазами [3].

В настоящее время доказано существование нескольких экзогенных факторов риска возникновения РМП. Наиболее значимым является курение [4]. Также к факторам риска относят работу на производстве лакокрасочных материалов и топлива, связанную с постоянным воздействием канцерогенов. Отягощенный онкологический анамнез рассматривается как фактор риска, связанный с наследственностью. В редких случаях РМП может быть частью наследственного онкологического синдрома, однако у большинства пациентов его можно рассматривать, как и другие онкологические заболевания, в качестве мультифакториальной патологии, развивающейся при наследственной предрасположенности и воздействии иницирующих факторов внешней среды [5, 6]. Классификация РМП на НМРМП и МИРМП важна, прежде всего, для выбора тактики лечения.

Адьювантная внутрипузырная терапия немышечно-инвазивного рака мочевого пузыря

При НМРМП «золотым стандартом» лечения является трансуретральная резекция (ТУР) мочевого

пузыря, которая позволяет выполнить полную эрадикацию опухолевых клеток. Однако проведение ТУР не всегда позволяет избавить пациента от рецидива заболевания. В связи с этим разрабатывают различные схемы послеоперационного лечения больных РМП. В частности, применяют однократное адьювантное внутрипузырное введение химиопрепарата (митомидин С, доксорубицин, эпирубицин, пирарубицин). Доказана эффективность этого вида адьювантной терапии, который снижает 5-летнюю частоту развития рецидивов, в среднем, с 59 до 45 % [7, 8]. Однократного внутрипузырного введения химиопрепарата достаточно для пациентов низкой группы риска развития рецидива. При промежуточном и высоком риске возможно назначение регулярной внутрипузырной химиотерапии, которая снижает риск возникновения рецидива в течение одного года после ТУР на 13–14 % [9, 10].

В 1976 г. А. Morales и соавт. впервые предложили проводить лечение НМРМП с помощью внутрипузырной инстилляции ослабленной живой *Mycobacterium bovis* (БЦЖ-вакциной, или BCG – Bacillus Calmette–Guerin). В последующие годы данный метод показал высокую эффективность [11, 12]. В отличие от внутрипузырной химиотерапии, адьювантная терапия живой вакциной БЦЖ достоверно снижает не только риск развития рецидива, но и риск прогрессирования. Однако проведение БЦЖ-терапии сопряжено с более выраженными и частыми побочными явлениями, в связи с чем этот метод лечения показан пациентам высокой группы риска рецидивирования и прогрессирования, так как не имеет преимуществ в безрецидивной выживаемости по сравнению с внутрипузырной химиотерапией у пациентов низкой группы риска [13, 14]. У больных промежуточного и высокого риска БЦЖ-терапия позволяет снизить риск возникновения

рецидива заболевания на 44 % по сравнению с ТУР без адъювантной лекарственной терапии. Оптимальным режимом внутривезикулярного введения вакцины БЦЖ являются 6 еженедельных инстилляций в дозе 120 мг с последующим переходом на поддерживающую терапию: при промежуточном риске рецидива – 3 еженедельных введения препарата на 3, 6 и 12-м месяцах; при высоком риске рецидива – 3 еженедельных введения препарата на 3, 6, 12, 18, 24, 30 и 36-м месяцах [15–17].

Механизм противоопухолевого действия вакцины БЦЖ заключается в том, что БЦЖ-вакцина воздействует на стенку мочевого пузыря и вызывает местный иммунный ответ. Это приводит к усилению функций $CD4^+$ - и $CD8^+$ -лимфоцитов, естественных киллеров, макрофагов и дендритных клеток в подслизистом слое, что, в свою очередь, опосредованно усиливает локальный противоопухолевый иммунитет [18]. Наиболее полно эксперименты, направленные на выяснение механизма действия вакцины БЦЖ при НМРМП, описаны в обзоре С. Pettenati и М.А. Ingersoll [19].

В ближайшие 4–6 ч после инстилляций вакцины БЦЖ в индукционном цикле отмечается массивная пиурия, содержащая нейтрофилы и мононуклеарные клетки. БЦЖ стимулирует экспрессию различных цитокинов (интерлейкины IL-1, -2, -4, -6, -8, -10 и -12, фактор некроза опухоли альфа (TNFA),

интерферон γ (IFN γ)). У больных с повышенной концентрацией IL-1, -2 и -8 в моче при применении вакцины БЦЖ наблюдается более выраженный противоопухолевый эффект. Вакцина БЦЖ вызывает активацию иммунокомпетентных клеток стенки мочевого пузыря с последующей генерацией популяции активированных клеток киллеров (ВАК-клетки), которые разрушают опухолевые клетки РМП [20, 21]. С учетом описанных изменений в стенке мочевого пузыря, активации иммунокомпетентных клеток и экспрессии цитокинов БЦЖ-терапию относят к разновидностям иммунотерапии при лечении онкологических заболеваний (см. рисунок) [19, 21, 22]. По данным метаанализа, опубликованного в 2018 г., БЦЖ-терапия является наиболее эффективным видом адъювантной внутривезикулярной терапии у пациентов с НМРМП [23, 24].

При этом остается открытым вопрос о возможных прогностических маркерах ответа на БЦЖ-терапию и внутривезикулярную химиотерапию, которые могут быть определены в ходе лабораторной диагностики. Также является существенным вопрос о генетических предикторах ответа на адъювантную терапию, которая может быть обусловлена как различными профилями молекулярно-генетических нарушений в опухолевых клетках, так и особенностями генома пациента.

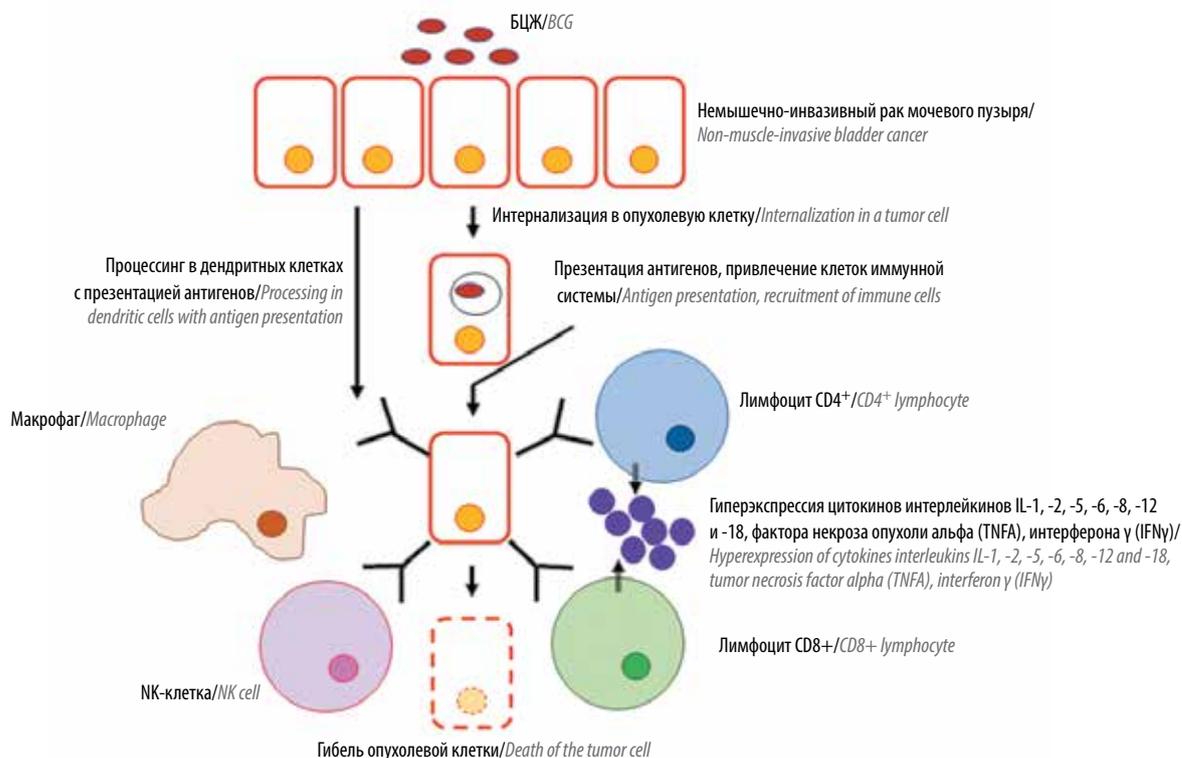


Схема действия БЦЖ-терапии (BCG – Bacillus Calmette–Guerin) при немышечно-инвазивном раке мочевого пузыря
Mechanism of action of BCG (Bacillus Calmette–Guerin) treatment for non-muscle-invasive bladder cancer

Генетические полиморфизмы, ассоциированные с прогнозом немышечно-инвазивного рака мочевого пузыря после адъювантной терапии

Индивидуальная реакция на химиотерапию отчасти зависит от совокупности многих низкопенетрантных аллелей в генах, участвующих в метаболизме ксенобиотиков, либо задействованных в патогенетической цепочке, на которую направлено действие препарата. При адъювантной химиотерапии РМП такие исследования в последние 5–7 лет крайне немногочисленны и касаются, в основном, азиатских популяций. Так, X. Deng и соавт. опубликовали работу, посвященную оценке влияния полиморфизма генов системы репарации ДНК на риск прогрессирования и рецидивирования у 244 больных РМП, получавших внутривенную химиотерапию препаратами эпирубицина и митомицин С. Показана ассоциация генотипов СС полиморфизма rs2854509 и ТТ полиморфизма rs3213255 в гене *XRCC1* с меньшей выживаемостью, тогда как гаплотип А-С/С-Т, напротив, был ассоциирован с лучшими показателями безрецидивной выживаемости при применении эпирубицина. Ген *XRCC1* кодирует фактор, участвующий в эксцизионной репарации небольших участков ДНК или одноцепочечных разрывов. Предполагают, что неблагоприятные генотипы соответствуют более активным формам *XRCC1*, которые восстанавливают повреждения ДНК, индуцированные эпирубицином, и тем самым способствуют выживанию опухолевых клеток [25]. В другой работе этого же автора показана ассоциация генотипа АА полиморфизма rs1695 в гене *GSTP1* и генотипа СС полиморфизма rs4925 в гене *GSTO1* с низким риском развития рецидива после применения эпирубицина. Эти гены кодируют ферменты из семейства глутатион-трансфераз, которые также участвуют в детоксикации ксенобиотиков [26]. Однако указанные результаты были получены при изучении полиморфизмов на китайских этнических группах и пока не подтверждены в исследованиях других популяций.

Исследования генетических полиморфизмов в связи с БЦЖ-терапией гораздо более многочисленны. С учетом иммунотерапевтического действия вакцины БЦЖ большинство из них сфокусированы на генах иммунного ответа. В первую очередь, гены-кандидаты выбирали из семейств провоспалительных цитокинов и их рецепторов, гиперэкспрессирующихся при воспалении или воздействии вакцины БЦЖ в стенке мочевого пузыря: IL-1 и его рецептора IL-1R, TNFA, IL-4, -6, -10, IFN γ (табл. 1) [27].

Одними из первых были изучены полиморфизмы D543N и (GT) n в гене *NRAMP1* (natural resistance-associated macrophage protein 1), также известном как *SLC11A1*, который кодирует фактор чувствительности макрофагов к внутриклеточному размножению микобактерий, ассоциированный с чувствительностью

Таблица 1. Полиморфизмы, ассоциированные с ответом на БЦЖ-терапию (BCG – *Bacillus Calmette–Guerin*)

Table 1. Polymorphisms associated with the response to BCG (*Bacillus Calmette–Guerin*) treatment

| Ген Gene | Полиморфизм Polymorphism | Ассоциация Association | Ссылка Reference |
|---------------|-----------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|
| <i>ATG2B</i> | rs3759601 | Аллель С – рецидив Allele C – recurrence | [28] |
| <i>CD44</i> | rs4755391 | Генотип ТТ – рецидив TT genotype – recurrence | [29] |
| <i>ERCC2</i> | rs1799793 | Генотип ТТ – рецидив TT genotype – recurrence | [30] |
| <i>FASL</i> | rs763110 | Генотип СС – рецидив CC genotype – recurrence | [31] |
| <i>GSS</i> | rs7265992 | Генотип АА – рецидив AA genotype – recurrence | [32] |
| <i>GSTT1</i> | wt-null | wt/wt – чувствительность к БЦЖ wt/wt – sensitivity to BCG | [33] |
| <i>ICAM1</i> | rs5498 | Генотип GG – рецидив GG genotype – recurrence | [34] |
| <i>IFNG</i> | rs2430561 | Генотип АА – рецидив AA genotype – recurrence | [35] |
| <i>IL1R1</i> | rs3732131 rs951193 | Генотип GG – рецидив GG genotype – recurrence Генотип ТТ – рецидив TT genotype – recurrence | [29] |
| <i>IL2RB</i> | rs228934 | Генотип АА – рецидив AA genotype – recurrence | [29] |
| <i>IL6</i> | rs1800795 | Генотип СС – чувствительность к БЦЖ CC genotype – sensitivity to BCG | [35] |
| <i>IL8</i> | rs4073 | Генотип АА – чувствительность к БЦЖ AA genotype – sensitivity to BCG | [35] |
| <i>IL17A</i> | rs2275913 | Генотип АА – рецидив AA genotype – recurrence | [34] |
| <i>IL2RA</i> | rs2104286 | Генотип ТТ – рецидив TT genotype – recurrence | [34, 35] |
| <i>IL17RA</i> | rs4819554 | Генотип АА – рецидив AA genotype – recurrence | [35] |
| <i>IL18</i> | rs187238 | Генотип GG – чувствительность к БЦЖ GG genotype – sensitivity to BCG | [30] |
| <i>NEIL2</i> | rs804256 rs804276 | Генотип СС – рецидив CC genotype – recurrence Генотип GG – рецидив GG genotype – recurrence | [34] |

Окончание табл. 1
End of table 1

| Ген Gene | Полиморфизм Polymorphism | Ассоциация Association | Ссылка Reference |
|----------------|-----------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|
| <i>NFKB</i> | -94ATTG/- | Генотип del/del – рецидив del/del genotype – recurrence | [35] |
| <i>NOS2</i> | (CCTTT)n | n < 13 – чувствительность к БЦЖ n < 13 – sensitivity to BCG | [36] |
| <i>NOS3</i> | rs2070744 rs1799983 | Генотип ТТ – чувствительность к БЦЖ TT genotype – sensitivity to BCG Генотип GG – чувствительность к БЦЖ GG genotype – sensitivity to BCG | [36] |
| <i>SLC11A1</i> | rs17235409 | Генотип GG – рецидив GG genotype – recurrence | [37, 38] |
| <i>TLR2</i> | rs5743700 | Генотип ТТ – рецидив TT genotype – recurrence | [29] |
| <i>TNFA</i> | rs1799964 | Генотип CC – чувствительность к БЦЖ, но не во всех исследованных выборках CC genotype – sensitivity to BCG but only in some samples | [34, 35] |
| <i>TRAILR1</i> | rs79037040 | Генотип ТТ – рецидив TT genotype – recurrence | [35] |
| <i>TRAIR1</i> | rs13278062 | Генотип ТТ – чувствительность к БЦЖ TT genotype – sensitivity to BCG | [34] |

к туберкулезной инфекции и вакцине БЦЖ. Обнаружены неблагоприятный генотип G/G и аллель 3* полиморфизмов D543N и (GT)n, соответственно, ассоциированные со снижением безрецидивного периода и выживаемости у пациентов с РМП после проведения БЦЖ-терапии [37, 38]. В другом исследовании были изучены функционально значимые полиморфизмы в промоторе генов *FAS* и *FASL*. Взаимодействие лиганда *FASL* с его рецептором *FAS* играет ключевую роль в апоптозе Т-клеток после выполнения ими своей функции в иммунном ответе. Показано, что РМП может продуцировать *FASL*, который атакует инфильтрирующие опухоль лимфоциты и ослабляет иммунный ответ. Это может иметь значение в снижении местного противоопухолевого ответа при иммунотерапии БЦЖ. В исследовании португальских пациентов

обнаружена ассоциация генотипа CC полиморфизма 844T/C в промоторе *FASL* с гиперэкспрессией этого гена и уменьшением безрецидивного периода после ТУР и БЦЖ-терапии [31]. В различных популяциях показана ассоциация генотипа GG полиморфизма rs187238 в гене *IL18* с эффективностью БЦЖ-терапии [30].

По данным метаанализа, включающего 113 оригинальных работ, показана ассоциация с эффективностью БЦЖ-терапии гомозиготных генотипов полиморфизмов в генах *IL6*, *IL8*, *IL2RA*, *IL17RA*, *TRAILR1*, *TNFA*, *NFKB*, *IFNG*, *TGFB* (см. табл. 1) [35]. На основании результатов других исследований этот список может быть дополнен генами *IL17A*, *IL18R1*, *ICAM1* в популяциях южной Европы [34]. Заслуживает внимания также исследование 372 SNP (single nucleotide polymorphism) в 27 генах иммунного ответа у 349 пациентов с РМП, результаты которого были валидированы затем на независимой выборке из 322 пациентов. Выявлены 15 SNP, ассоциированные с прогрессированием РМП после БЦЖ-терапии. Из них при сопоставлении с данными других работ при метаанализе наиболее выраженную ассоциацию с рецидивом РМП показали 5 полиморфизмов в генах *IL1R1*, *IL2RB*, *TLR2*, *CD44* [29].

Инстиляция вакцины БЦЖ вызывает, в том числе, местный оксидативный стресс, который может модулировать противоопухолевый иммунный ответ. В одной из работ были исследованы 276 однонуклеотидных замен в 38 генах, задействованных в ответе на оксидативный стресс, на выборке из 421 пациента с НМРМП. Идентифицированы 4 SNP в гене *NEIL2*, ассоциированные с ответом на БЦЖ-терапию [39]. В цитотоксический эффект, возникающий при местном иммунном ответе на вакцину БЦЖ, вовлечен оксид азота (NO). Показано, что аллели длиной менее 13 CCTTT-пентануклеотидов в промоторном полиморфизме гена *NOS2* и генотипы ТТ и GG полиморфизмов rs2070744 и rs1799983 в гене *NOS3* ассоциированы с лучшей выживаемостью после БЦЖ-терапии НМРМП (см. табл. 1). Эти гены кодируют ферменты NO-синтазы, которые производят NO при конверсии аминокислоты аргинина в цитруллин [36].

Среди генов, непосредственно не относящихся к обеспечению функционирования иммунной системы, можно отметить ассоциацию эффективности БЦЖ-терапии с гомозиготами по нормальным аллелям гена *GSTT1*, относящегося к семейству глутатион-трансфераз, и полиморфизма в гене глутатион-пероксидазы *GPX1* (в отношении этого гена имеются противоречивые результаты), участвующих в детоксикации ксенобиотиков [33, 37, 38]. В более позднем исследовании выявлен неблагоприятный генотип AA полиморфизма rs7265992 в гене глутатион-синтазы (*GSS*), ассоциированный с рецидивом после

БЦЖ-терапии [32]. В метаанализе с рецидивом после БЦЖ-терапии также был ассоциирован генотип ТТ полиморфизма rs1799793 в гене *ERCC2*, участвующего в эксцизионной репарации [30]. Результаты исследования эпигенетического репрограммирования моноцитов в ответ на инстилляцию вакцины БЦЖ показали, что с рецидивом ассоциирован аллель С полиморфизма rs3759601 в гене *ATG2B*, участвующего в аутофагии [28]. Обобщенные сведения о генетических полиморфизмах, показавших ассоциацию с эффективностью БЦЖ-терапии, представлены в табл. 1.

Необходимо отметить, что очевидное преимущество SNP в виде легкости и дешевизны их генотипирования на современном уровне развития молекулярно-генетических технологий нивелируется, с одной стороны, возможной популяционной специфичностью выявленных ассоциаций, с другой — низкой пенетрантностью SNP и, как следствие, невысокой клинической значимостью. В связи с этим в последние годы исследователи чаще рассматривают другие типы биомаркеров.

Особенности метилирования генов у пациентов с разной эффективностью БЦЖ-терапии

Метилирование ДНК является одним из способов регуляции экспрессии генов. У человека метильная группа присоединяется к пиримидиновому кольцу цитозина в составе динуклеотида CG. Скопления CG-динуклеотидов в 5'-регуляторных областях генов образуют CpG-островки. Метилирование такого CpG-островка приводит к формированию компактной структуры хроматина и подавлению экспрессии гена, представляя собой эпигенетический уровень регуляции генной активности. В процессе канцерогенеза общий уровень метилирования генома снижается, что приводит к увеличению его нестабильности. В то же время локально гиперметируются CpG-островки в генах-супрессорах, что способствует их сайленсингу и стимулированию деления опухолевых клеток. Аберрантное метилирование происходит на разных стадиях канцерогенеза, в том числе, на начальных этапах развития опухоли. При НМРМП описано гиперметилование десятков генов-супрессоров, которое ассоциировано с прогрессией опухоли, а также может быть выявлено в осадке мочи или плазме крови в контексте разработки маркеров для неинвазивной диагностики заболевания. Вместе с тем, исследования метилирования как потенциального прогностического маркера эффективности БЦЖ-терапии крайне немногочисленны [40].

В работе М. Agundez и соавт. в материале опухоли исследованы 25 генов-супрессоров методом метилспецифической мультиплексной реакции амплификации лигированных зондов (MLPA) в группе промежуточного прогноза РМП (T1G3). Дифференциальное

метилирование было показано для генов *PAX6*, *MSH6*, *RBI*, *THBS1*, *PYCARD*, *TP73*, *ESR1*, *GATA5*. Статус метилирования этих генов позволял разделять пациентов после БЦЖ-терапии на группы низкого и высокого риска развития рецидива [41]. В работе других авторов аналогичным методом изучено метилирование панели генов-супрессоров у 82 пациентов с НМРМП высокой группы риска, получавших БЦЖ-терапию. Вероятность прогрессирования или рецидива была выше у пациентов с отсутствием метилирования генов *CDKN2B* ($p = 0,00312$) и *MUS81* ($p = 0,0191$) [42]. Также опубликованы работы, в которых показана ассоциация рецидива РМП с метилированием генов миодипина и *PMF1* [37]. Проблема анализа метилированных локусов в качестве лабораторных маркеров заключается в их низкой воспроизводимости. Частота метилирования во многом зависит от выбора анализируемого участка CpG-островка и дизайна праймеров (зондов), особенностей реакции амплификации (MLPA, метилспецифической полимеразной цепной реакции — МС ПЦР). Патогенетически изменения уровня метилирования генов в ткани мочевого пузыря лишь опосредованно связаны с действием вакцины БЦЖ. Более приближенным к механизму воздействия БЦЖ-терапии является оценка изменения экспрессии генов как на уровне матричной РНК, так и на уровне конечных белковых продуктов.

Экспрессионные генетические профили при проведении адьювантной терапии немышечно-инвазивного рака мочевого пузыря

Первые белковые маркеры, ассоциированные с ответом на БЦЖ-терапию, были определены иммуноферментными методами в моче пациентов с НМРМП. Большинство из них представлены цитокинами, которые гиперэкспрессируются при индуцированном вакциной БЦЖ воспалении в стенке мочевого пузыря (IL-2, -6, -8, -10, -12; TRAIL, IFN γ и др.). Показано, что из широкой палитры анализируемых цитокинов только концентрация IL-2 достоверно ассоциирована с продолжительностью безрецидивного периода после БЦЖ-терапии в ряде независимых исследований [43].

G. Poli и соавт. опубликовали работу, посвященную оценке уровня экспрессии генов *NLRP3*, *NLRP4*, *NLRP9* и *NAIP* методом ПЦР в реальном времени в зависимости от проведения внутривезикулярной БЦЖ-терапии пациентам с НМРМП высокой группы риска прогрессирования. Семейство NOD-подобных рецепторов (*NLRP3*, *NLRP4*, *NLRP9*, *NAIP*) в организме человека вовлечено в воспалительный ответ и образование инфламмосом при контакте с бактериальным агентом, опосредованно стимулируя местный иммунитет. В исследование были включены 20 пациентов с Ta-T1 низкодифференцированным РМП, ранее не получавших БЦЖ-терапию. У больных брали

осадок мочи до операции, после нее и после каждой внутрипузырной инстиляции БЦЖ (индукционный курс — 6 введений). Медиана наблюдения составила 14 мес. Экспрессия генов *NLRP4* и *NLRP9* после операции значительно увеличилась, в то время как *NLRP3* и *NAIP* осталась без значимых изменений. Также экспрессия генов *NLRP4* и *NLRP9* до проведения БЦЖ-терапии была выше у пациентов с последующим рецидивом [44]. Другие авторы продемонстрировали, что в стенке мочевого пузыря после внутрипузырной инстиляции БЦЖ возрастает экспрессия генов цитокинов *TNFA* и *TOLLIP* [45].

Оценка экспрессии на уровне белка с помощью иммуногистохимического метода также позволила выявить некоторые прогностические маркеры. В частности, результаты исследования экспрессии белков теплового шока у 54 пациентов в группе T1G2/3 показали, что положительная окраска более 65 % клеток на HSP60 и <5 % на HSP70 ассоциирована с прогрессированием заболевания после БЦЖ-терапии [46]. С чувствительностью к БЦЖ-терапии ассоциирована гиперэкспрессия транскрипционного фактора E2F4 [35]. По данным метаанализа, включившего 11 оригинальных работ, гиперэкспрессия антигена ki-67 ассоциирована с временем до прогрессирования, но не с безрецидивной выживаемостью пациентов с НМРМП после БЦЖ-терапии [47].

Экспрессионные маркеры резистентности к химиотерапии менее изучены. В качестве примера модельных экспериментов можно привести работу на клеточной линии РМП М-RT4, в которой показана ассоциация гиперэкспрессии хемокина CXCL5 с резистентностью опухоли к митомицину С. Ее механизмы связаны с эпителиально-мезенхимальной трансформацией и активацией сигнального пути NFκB [48]. В образцах ткани РМП и клеточной культуре было изучено влияние микро-РНК на прогноз заболевания. Показано, что гиперэкспрессия miR-31 ингибирует пролиферацию, миграцию и инвазию опухолевых клеток. Экспрессия miR-31 коррелировала с эффективностью внутрипузырной химиотерапии препаратом митомицин С. Эксперименты *in vitro* и на ксенографтных моделях позволили сделать вывод о том, что подавление роста опухолевых клеток miR-31 реализует через одну из основных своих мишеней — ген трансмембранного интегринового рецептора *ITGA5*, участвующий в регуляции пролиферации клеток мочевого пузыря при их взаимодействии с компонентами внеклеточного матрикса [49]. В целом экспрессионные профили пока не нашли широкого применения как предиктивные тесты при химио- и иммунотерапии НМРМП в силу их невысокой воспроизводимости и высокой себестоимости относительно других потенциальных молекулярно-генетических маркеров [50]. Отдельного внимания заслуживают изменения экспрессии генов

системы репарации, которые могут отражать степень нестабильности опухолевого генома.

Экспрессия генов системы репарации ДНК и микросателлитная нестабильность в контексте эффективности БЦЖ-терапии немышечно-инвазивного рака мочевого пузыря

В начале 2018 г. опубликовано исследование 67 пациентов, в котором оценивалась роль изменения экспрессии ключевых участников системы репарации MLH1, MSH2 и эпидермального фактора роста 2 (ERBB2, или HER-2) в прогнозировании течения низкодифференцированного РМП (T1) с помощью иммуногистохимического метода. Пациентов в дальнейшем разделили на 5 групп: 0 — нет повышения экспрессии; I — гиперэкспрессия одного из белков; II — гиперэкспрессия HER-2 или обоих белков репарации; III — экспрессия HER-2 и одного из белков репарации; IV — экспрессия HER-2 и обоих белков репарации. Безрецидивная выживаемость составила 100, 36, 32, 27 и 0 %, а выживаемость без прогрессирования — 100, 80, 73, 70 и 44 % в порядке увеличения номера группы соответственно. Кроме того, гиперэкспрессия HER-2 являлась предиктором выживаемости без прогрессирования и безрецидивной выживаемости у всей когорты пациентов, в то время как экспрессия MLH1 — предиктором выживаемости без прогрессирования только в группе пациентов, получавших БЦЖ-терапию. Таким образом, был сделан вывод о том, что уровень экспрессии MLH1, MSH2 и HER-2 находится в обратной корреляции с выживаемостью без прогрессирования и рецидивом НМРМП [51].

РМП занимает 3-е место по частоте мутаций генов репарации среди других злокачественных опухолей. Однако эти мутации распределяются неравномерно в зависимости от типа повреждения, подтипа РМП, локализации в тех или иных генах. Подавляющее большинство мутаций происходят в первичном МИРМП или в прогрессирующем и метастазирующем РМП, а не в НМРМП. Наиболее часто точечные мутации локализованы в генах *RB1* (13 %), *ERCC2* (12 %), *ATM* (12 %), *BRCA2* (8 %), *FANCD2* (6 %), *BRCA1* (3 %), *MLH1* (3 %). Если рассматривать протяженные делеции и амплификации, то в числе часто мутируемых окажутся *RB1* (9,0 %), *FANCD2* (9,0 %), *BRCA2* (5,0 %), *PMS2* (4,0 %), *MLH1* (2,9 %), *ERCC2* (2,5 %), *PALB2* (2,5 %), *CHEK2* (2,5 %). Из приведенных списков видно, что при МИРМП чаще мутируют гены, отвечающие за репарацию одно- и двуцепочечных разрывов ДНК и эксцизионную репарацию. Не удивительно, что опухоли с соматическими мутациями этих генов более чувствительны к цисплатину, который вносит множественные повреждения в нуклеиновые кислоты и образует ДНК-аддукты. Однако для адьювантной терапии НМРМП эти данные имеют мало

практического значения. Изменение экспрессии генов репарации неспаренных оснований (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS1*, *PMS2*) может отражаться в эффективности репарирования ошибок репликации простых tandemных повторов (short tandem repeat (STR)). Это может быть обнаружено с помощью теста на микросателлитную нестабильность (microsatellite instability (MSI)). Однако в настоящее время частоту MSI в РМП оценивают на довольно низком уровне (<1 %), при общем довольно высоком уровне мутационной нагрузки более 8 мутаций на 1 м.п.н. [52, 53]. Таким образом, для оценки мутаций как прогностических критериев адьювантной терапии НМРМП вряд ли возможно просто генотипировать несколько точек в геномной ДНК, целесообразно исследовать полноэкзомный профиль или хотя бы секвенировать обоснованно составленную генную панель.

Мутационная нагрузка и ее прогностическая роль при иммунотерапии немышечно-инвазивного рака мочевого пузыря

При РМП в геноме опухолевых клеток происходят мутации практически всех известных типов. Довольно большое количество исследований опубликовано на тему хромосомных aberrаций при НМРМП. Однако лишь немногие из них затрагивают аспект их влияния на эффективность БЦЖ-терапии. В одной из работ показано, что делеция района 9p21 является неблагоприятным прогностическим признаком, ассоциированным с резистентностью опухоли к БЦЖ-терапии [35]. Опубликована работа, в которой авторы провели флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH) на клетках из осадка мочи у 114 пациентов с НМРМП промежуточного и высокого риска прогрессирования во время проведения БЦЖ-терапии. Для этого они использовали тест-систему UroVysion, которая анализирует изменения численности хромосом 3, 7, 17 и локуса 9p21. Показано, что положительный результат FISH на 3-м месяце инстилляции вакцины БЦЖ ассоциирован с рецидивом НМРМП. Вместе с тем, выбранный метод имеет ряд ограничений в интерпретации при пограничном уровне хромосомных aberrаций, малом количестве атипичных клеток в осадке мочи и некоторых других ситуациях [54].

Большинство генетических нарушений при РМП представляют собой точечные мутации. Развитие технологий секвенирования следующего поколения (next generation sequencing (NGS)) привело к настоящей революции в молекулярной онкологии, позволило проводить глубокое профилирование соматических мутаций. Такие работы проведены и в отношении РМП. Главный итог этих исследований — НМРМП и МИРМП развиваются по двум разным механизмам. НМРМП развивается, преимущественно, через гиперплазию, для него характерны точечные мутации в онкогенах

FGFR3, *PIK3CA*, *ERBB2*, генах RAS-киназ, но практически не встречаются мутации *TP53*. Для МИРМП на начальных этапах свойственны мутации в генах ремоделирования хроматина и сегрегации хроматид (*ARID1A*, *UTX*, *KDM6A*, *EP300*, *ESPL1* и др.), что приводит к множественным одномоментным хромосомным перестройкам — хромотрипсису — и дальнейшему нарастанию геномной нестабильности, при этом отмечают высокую частоту мутаций *TP53* и *RBI* [55, 56]. На основании морфологических и иммуногистохимических характеристик, мутаций и профилей экспрессии генов выделяют подгруппы РМП, имеющие прогностическое значение: базальный, люминальный, p53-подобный и др., а также молекулярные профили TCGA (The Cancer Genome Atlas) — 4 подтипа РМП. Эта база данных международного онкологического консорциума содержит сведения о точечных мутациях, изменениях экспрессии структурных генов и регуляторных РНК, aberrантном метилировании генов в разных типах опухолей человека [55, 57].

Анализ соматических мутаций с использованием NGS позволил идентифицировать мутационные профили, которые ассоциированы с прогнозом НМРМП и вносят свой вклад в развитие заболевания независимо от адьювантной терапии, что необходимо учитывать при разработке прогностических классификаторов. В частности, опубликована работа, в которой исследовали 23 пациента из высокой группы риска T1G2/3, у 15 из них не было прогрессирования заболевания — группа ремиссии (медиана наблюдения 53 мес), у 8 выявлено прогрессирование — группа прогрессирования (pT2+ или N+). Медиана наблюдения до прогрессирования составила 9 мес. Дополнительно в исследование включена группа из 11 больных метастатическим РМП — метастатическая группа. Секвенирование показало, что наиболее часто в этой выборке РМП мутировали гены *TERT*, *TP53*, *RBI*, *PIK3CA*, *PTEN*, *KMT2D*, *ARID1A*. Достоверно различалась частота делеций *CDKN2A/B*: 6 % в группе ремиссии против 37 % в группе прогрессирования. С помощью NGS определена мутационная нагрузка в ДНК опухолевой ткани: в группе ремиссии — 15 мутаций/м.п.н.; в группе прогрессирования до БЦЖ-терапии и после нее — 12,8 и 10,1 мутаций/м.п.н. соответственно; в метастатической группе — 5,1 мутаций/м.п.н. Таким образом, авторы сделали вывод о том, что чем выше уровень мутационной нагрузки в опухолевой ткани, тем выше эффективность от внутривезикулярной иммунотерапии [58].

В аналогичной работе секвенировали ДНК из 105 опухолей, полученных от пациентов с НМРМП. Наиболее часто мутации выявляли в генах *TERT*, *FGFR3*, *ERBB2*, генах репарации (суммарно до 30 % случаев). Показано, что мутации генов репарации

ассоциированы с возрастанием мутационной нагрузки. Интересно, что авторы выделили подгруппу пациентов, получавших БЦЖ-терапию. С рецидивом в этой подгруппе были ассоциированы мутации гена ремоделирования хроматина *ARID1A*, который часто мутирует в первичном МРМП [59]. В обзоре в том же 2017 г. определен перечень из 12 генов, мутации в которых ассоциированы с прогнозом НМРМП, и подтверждено прогностическое значение мутаций *ARID1A* и генов репарации в опухолях пациентов, получавших БЦЖ-терапию [60].

Особый интерес в контексте неинвазивной диагностики вызывает возможность проводить NGS мутаций с прогностическим значением во время или после БЦЖ-терапии по ДНК из осадка мочи. S.N. Scott и соавт. секвенировали панель из 341 гена, вовлеченного в канцерогенез, с чувствительностью до 2 % мутантных аллелей в ДНК из осадка мочи, полученной от 41 пациента с НМРМП высокой группы риска. В группу прогрессирования были отнесены 29 пациентов, в группу ремиссии — 12 (безрецидивная выживаемость 24 мес). Все пациенты получали внутривезикулярную БЦЖ-иммунотерапию. Мутации генов *RMB10* и *EPHA3* чаще встречались в группе ремиссии. Напротив, мутации генов *ARID1A*, *EP300*, *CDKN1A* чаще встречались в группе прогрессирования. Другими словами, определение мутаций с прогностическим значением в отношении БЦЖ-терапии методами NGS возможно и на материале осадка мочи [61]. Приведенные примеры относятся к исследованиям иммунотерапии НМРМП вакциной БЦЖ при локализованных формах заболевания. В последние годы к иммунотерапии РМП относят также быстро развивающуюся таргетную терапию ингибиторами иммунных контрольных точек.

Таргетная иммунотерапия рака мочевого пузыря: мишени и возможные генетические предикторы ответа

Таргетная терапия препаратами иммунных контрольных точек применяется, как правило, при местнораспространенных и метастатических формах РМП, а не при НМРМП, и, казалось бы, прямо не относится к теме обзора. Однако накапливаются данные о том, что ассоциированные с эффективностью БЦЖ-иммунотерапии генетические изменения могут иметь предиктивное значение и при таргетной иммунотерапии (табл. 2).

При РМП используют ингибиторы рецептора программируемой клинической смерти 1 (PD-1) — пембролизумаб, его лиганда 1-го типа (PD-L1) — атезолизумаб, авелумаб, дурвалумаб и др., а также блокаторы антигена цитотоксических лимфоцитов 4 (CTLA4), например, ипилимумаб. Результаты клинических испытаний показали преимущество пембролизумаба по сравнению с химиотерапией 2-й линии

при резистентном уротелиальном раке, препараты атезолизумаб, ниволумаб, авелумаб и дурвалумаб также рекомендованы для лечения цисплатин-рефрактерных опухолей [62, 63].

Механизм действия этих препаратов заключается в блокировании на уровне рецепторов или лигандов сигнальных путей в Т-лимфоцитах, которые снижают их цитотоксическую активность в отношении опухолевых клеток. Рецептор клеточной гибели PD-1 (CD279) экспрессируется на активированных Т-лимфоцитах и антигенпрезентирующих клетках (макрофаги, дендритные клетки). Этот рецептор активируется лигандом PD-L1 (CD274) и, в меньшей мере, PD-L2, в синтезе которых принимают участие различные типы антигенпредставляющих, стволовых, лимфоцитарных и других клеток. После взаимодействия рецептора с лигандом происходит фосфорилирование его центрального домена, и в Т-лимфоците запускается сигнальный путь, приводящий к снижению продукции цитокинов, участвующих в противоопухолевом ответе. Рецептор CTLA4 также экспрессируется на Т-клетках и конкурирует с рецептором CD28 за связывание с лигандами семейства B7. После связывания CTLA4 с лигандом запускается сигнальный путь, направленный на подавление противоопухолевой активности Т-лимфоцита [64]. Показано, что экспрессия PD-L1 нарастает по мере прогрессии опухоли и ассоциирована с неблагоприятным прогнозом РМП [65].

Можно предположить, что чем больше новых белков, отличных от нормальных клеток, будет экспрессировать опухолевая клетка, тем в большей мере она будет представлять собой мишень для иммунотерапии. Опухолевые неоантигены являются продуктом экспрессии мутировавших генов, поэтому чем больше мутаций, особенно, в генах репарации возникает в опухоли, тем более высокой ожидается чувствительность таких случаев к иммунотерапии, в том числе препаратами иммунных контрольных точек. Эта гипотеза нашла подтверждение при исследовании опухолей с относительно высокими частотами MSI, которая отражает инактивацию генов репарации неспаренных нуклеотидов. Причем ассоциация с чувствительностью к ингибиторам контрольных точек показана только для случаев выраженной MSI (MSI-H), в которых дополнительные аллели в опухоли образуют 2 и более из 5 исследованных STR-маркеров. Статус MSI-H признан достоверным предиктором эффективности пембролизумаба, его определение вошло в диагностические алгоритмы при назначении этого препарата независимо от типа опухоли. Однако наиболее достоверные и полные результаты применения пембролизумаба у пациентов с MSI-H относятся к колоректальному раку, при котором частота MSI составляет около 15 %. Имеет ли MSI такое же клиническое значение при РМП — сложный вопрос, так как часто-

Таблица 2. Молекулярные предиктивные маркеры при иммунотерапии рака мочевого пузыря

Table 2. Predictive molecular markers in immunotherapy of bladder cancer

| Анализ Analysis | Метод Method | Преимущества Advantages | Недостатки Disadvantages |
|-------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| БЦЖ-терапия <i>BCG</i> | | | |
| Концентрация IL-2 в моче IL-2 level in urine | ИФА ELISA | Недорогой и относительно простой тест Inexpensive and relatively simple test | Низкая предиктивная ценность Low predictive value |
| Полиморфизмы (SNP) SNPs | ПЦР в различных модификациях Various types of PCR | Общедоступные и недорогие технологии генотипирования Widely accessible and inexpensive genotyping technologies | Низкая пенетрантность аллелей и генотипов Low allele and genotype penetrance |
| ЭП EP | Гибридизация на микрочипах, секвенирование транскриптома (NGS) Microarray hybridization, transcriptome sequencing (NGS) | Высокая прогностическая ценность панели маркеров в конкретных исследованиях High prognostic values of marker panels in certain studies | Высокая себестоимость, требования к качеству РНК в образце, низкая воспроизводимость High prime cost, requirements for sample RNA quality, low reproducibility |
| Метилирование ДНК DNA methylation | МС-ПЦР MS-PCR | Один метод анализа, основанный на ПЦР One analysis method based on PCR | Низкая предиктивная ценность, мало опубликованных работ Low predictive value, small number of published studies |
| Мутационная нагрузка Mutational load | NGS | Высокая прогностическая значимость High prognostic significance | Нет единых подходов к оценке мутационной нагрузки и ее пороговому уровню, пока относительно высокая себестоимость No general approach to evaluation of mutational load and its threshold value, high prime cost at the moment |
| Ингибиторы иммунных контрольных точек <i>Immune checkpoint inhibitors</i> | | | |
| Экспрессия PD-L1 PD-L1 expression | ИГХ IHC | Общедоступный и недорогой тест Widely accessible and inexpensive test | Низкая ценность положительного результата, дискордантность между антителами разных производителей Low value of a positive results, discordance between antibodies from different manufacturers |
| ЭП EP | « | « | « |
| Кластеры TCGA TCGA clusters | NanoString или ПЦР-РВ, ПЦР и секвенирование по Сэнгеру + гистология NanoString or RT-PCR, PCR and Sanger sequencing + histology | Высокая предиктивная ценность, согласуются с другими критериями прогноза High predictive value, agreement with other prognostic criteria | Необходимость использовать несколько разных молекулярных методов, относительно высокая себестоимость Use of several different molecular techniques, relatively high prime cost |
| Мутационная нагрузка Mutational load | Секвенирование генных панелей или экзома (NGS) Gene panel or exome sequencing (NGS) | Наиболее высокая прогностическая значимость, быстро развивающаяся технология Highest prognostic significance, quickly developing technology | « |

Примечание. БЦЖ – бацилла Кальметта–Герена; ИФА – иммуноферментный анализ; SNP – single nucleotide polymorphism; ПЦР – полимеразная цепная реакция; ЭП – экспрессионный профиль генов; NGS – секвенирование следующего поколения; МС-ПЦР – метилспецифическая ПЦР; ИГХ – иммуногистохимический анализ; TCGA – The Cancer Genome Atlas; ПЦР-РВ – ПЦР в реальном времени; « – совпадает с идентичной характеристикой выше.

Note. BCG – Bacillus Calmette–Guerin; ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay; SNP – single nucleotide polymorphism; PCR – polymerase chain reaction; EP – gene expression pattern; NGS – next-generation sequencing; MS-PCR – methylation-specific PCR; IHC – immunohistochemical analysis; TCGA – The Cancer Genome Atlas; RT-PCR – real-time PCR; « – same as the characteristic in BCG table.

та MSI при РМП не превышает 1 % случаев и масштабных работ по изучению предиктивной ценности MSI применительно к иммунотерапии при этом заболевании не проводилось [66].

Поскольку РМП находится в числе первых 3 типов опухолей с наибольшим количеством мутаций в геноме (причем опухоли с сопоставимым количеством мутаций отвечают на ингибиторы иммунных контрольных точек), но с низкой частотой MSI, вполне резонно стоит вопрос: связан ли общий уровень мутационной нагрузки с ответом на таргетную иммунотерапию при РМП? На примере немелкоклеточного рака легкого, меланомы и РМП показано, что мутационная нагрузка коррелирует с ответом на ингибиторы PD-1/PD-L1: различия медиан в чувствительных и резистентных группах составили 12,4 против 6,4 мутаций на 1 млн п.н. В исследовании с условной градацией на 4 группы по мутационной нагрузке выраженный ответ наблюдался в 4-й группе с максимальной мутационной нагрузкой более 16 мутаций на 1 млн п.н. Таким образом, мутационная нагрузка является предиктором ответа на иммунотерапию РМП в целом как на БЦЖ-терапию, так и на ингибиторы иммунных контрольных точек [58, 67, 68]. Вместе с тем, внедрению теста на определение мутационной нагрузки в клиническую практику, помимо высокой стоимости анализа, пока препятствует ряд методических причин: нет общепринятого порогового уровня для разделения условно низкой и высокой мутационной нагрузки; в одних работах мутации нормированы на количество нуклеотидов в секвенированных геномных панелях, в других — на экзом с различной глубиной прочтений; в зависимости от разных способов подготовки библиотек и выбранной платформы NGS в секвенированных мутациях могут быть неудовлетворительно мало представлены те или иные классы мутаций (транслокации, химерные гены, протяженные делеции и т.д.); наконец, многое зависит от выбранных алгоритмов для аннотации найденных соматических и герминальных генетических вариантов.

Рассматривая другие молекулярно-генетические классификаторы, отметим, что с чувствительностью к атезолизумабу ассоциирован II кластер TCGA (характеризуется гиперэкспрессией генов дифференцировки уротелия — *FOXA1*, *GATA3*, *ERBB2*, *UPK3A*), а к ниволумабу — III кластер (в нем на высоком уровне находится экспрессия генов, более характерных для базального и SCCL-молекулярных подтипов РМП — *KRT5*, *KRT14*, *KRT6A*, *EGFR*) [69, 70].

Можно ли прогнозировать эффективность таргетной иммунотерапии только лишь на основе молекулярных мишеней? В целом гиперэкспрессия PD-L1 на инфильтрирующих опухоль клетках иммунной системы ассоциирована с чувствительностью опухоли к ингибиторам PD-1/PD-L1. Однако при проведении

клинических исследований иммуногистохимический тест на экспрессию PD-L1 характеризовался низкой прогностической ценностью положительного результата. Это обусловлено разной аффинностью антител от различных производителей, отсутствием единого мнения о пороговом уровне экспрессии PD-L1 и типах клеток в препарате, в которых ее целесообразно оценивать [69, 71]. Представляют интерес исследования экспрессии PD-L1 при лечении НМРМП БЦЖ-терапией. Опубликована работа, в которой сравнивали экспрессию PD-L1, PD-L2 и CD8 до и после БЦЖ-терапии иммуногистохимическим методом в 22 случаях БЦЖ-резистентного НМРМП. Показано, что БЦЖ-терапия способствует увеличению экспрессии PD-L1, но не PD-L2. Другими словами, с одной стороны, БЦЖ-терапия стимулирует локальный противоопухолевый иммунитет, с другой — в части случаев она ассоциирована с гиперэкспрессией в опухоли сигнальных молекул, которые снижают цитотоксическую активность Т-лимфоцитов и помогают опухолевым клеткам избежать гибели [72]. Этот эффект БЦЖ-терапии был подтвержден также в модельных экспериментах на грызунах [73]. Возможно, комбинированная терапия БЦЖ-вакциной и ингибиторами PD-L1 дала бы более выраженный противоопухолевый эффект, но это является предметом дальнейших исследований.

Отметим, что в настоящее время проходят 5 клинических испытаний ингибиторов иммунных контрольных точек у пациентов с НМРМП, резистентных к БЦЖ-терапии. Причем исследуют группы, не получавшие вакцину БЦЖ, резистентные к БЦЖ-терапии, с рецидивом в периоды после завершения БЦЖ-терапии, в качестве способа введения таргетных препаратов фигурируют и внутрипузырные инстилляции [74, 75]. Если эти исследования покажут эффективность таргетной иммунотерапии НМРМП, область применения прогностических тестов на основе определения мутационной нагрузки при РМП в будущем может значительно расшириться.

Заключение

Эффективность адьювантной терапии при НМРМП зависит, в том числе, от особенностей геномов опухолевой клетки и самого пациента. В первом случае речь идет о совокупности соматических мутаций, aberrантного метилирования и измененной экспрессии генов в опухоли, во втором — об унаследованных сочетаниях аллелей в генах иммунного ответа, биотрансформации ксенобиотиков. Исследования в этой области, в основном, сфокусированы на БЦЖ-терапии, а не на внутрипузырной химиотерапии, что объясняется большей эффективностью этого метода и тем фактом, что ряд предиктивных факторов оказался общим при БЦЖ-терапии НМРМП и таргетной терапии ингибиторами

иммунных контрольных точек при распространенных формах РМП. В построении прогностических молекулярных классификаторов адьювантной терапии целесообразно учитывать концентрацию провоспалительных цитокинов в моче (IL-2), клинические (время между ТУР и первой инстилляцией, дозы и режим БЦЖ-терапии), иммуногистохимические (PD-L1) и молекулярно-генетические факторы (мутационная нагрузка, в зависимости от показаний – полиморфизмы, экспрессионные профили, хромосомные aberrации, точковые мутации *ARID1A*, *CDKN2A/B*). Среди изученных к настоящему времени генетических

критериев прогноза иммунотерапии РМП многообещающим выглядит определение мутационной нагрузки, однако для внедрения этого теста необходим консенсус о методике расчета мутационной нагрузки, ее условном пороговом уровне для разделения пациентов по группам риска при иммунотерапии НМРМП. Таким образом, ассоциированные с ответом на адьювантную терапию НМРМП генетические факторы довольно разнообразны и представлены всеми типами структурно-функциональных нарушений генома человека при канцерогенезе, некоторые из них уже сейчас можно считать потенциальными маркерами прогноза.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Злокачественные новообразования в России в 2016 году (заболеваемость и смертность). Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2018. 250 с. [Malignant tumors in Russia in 2016 (morbidity and mortality). Eds.: A.D. Kaprin, V.V. Starinskiy, G.V. Petrova. Moscow: MNIOI im. P.A. Gertsena – filial FGBU “NMIRTS” Minzdrava Rossii, 2018. 250 p. (In Russ.)].
2. Ferlay J., Soerjomataram I, Dikshit R. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 2015;136(5):E359–86. DOI: 10.1002/ijc.29210. PMID: 25220842.
3. Comperat E., Larre S., Roupert M. et al. Clinicopathological characteristics of urothelial bladder cancer in patients less than 40 years old. *Virchows Arch* 2015;466(5):589–94. DOI: 10.1007/s00428-015-1739-2. PMID: 25697540.
4. Freedman N.D., Silverman D.T., Hollenbeck A.R. et al. Association between smoking and risk of bladder cancer among men and women. *JAMA* 2011;306(7):737–45. DOI: 10.1001/jama.2011.1142. PMID: 21846855.
5. Burger M., Catto J.W., Dalbagni G. et al. Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer. *Eur Urol* 2013;63(2): 234–41. DOI: 10.1016/j.euro-uro.2012.07.033. PMID: 22877502.
6. Colt J.S., Friesen M.C., Stewart P.A. et al. A case-control study of occupational exposure to metalworking fluids and bladder cancer risk among men. *Occup Environ Med* 2014;71(10):667–74. DOI: 10.1136/oemed-2013-102056. PMID: 25201311.
7. Sylvester R.J., Oosterlinck W., Holmang S. et al. Systematic review and individual patient data meta-analysis of randomized trials comparing a single immediate instillation of chemotherapy after transurethral resection with transurethral resection alone in patients with stage pTa–pT1 urothelial carcinoma of the bladder: which patients benefit from the instillation? *Eur Urol* 2016;69(2):231–44. DOI: 10.1016/j.eururo.2015.05.050. PMID: 26091833.
8. Abern M.R., Owusu R.A., Anderson M.R. et al. Perioperative intravesical chemotherapy in non-muscle-invasive bladder cancer: a systematic review and meta-analysis. *J Natl Compr Canc Netw* 2013;11(4): 477–84. PMID: 23584348.
9. Huncharek M., McGarry R., Kupelnick B. Impact of intravesical chemotherapy on recurrence rate of recurrent superficial transitional cell carcinoma of the bladder: results of a meta-analysis. *Anticancer Res* 2001;21(1B):765–9. PMID: 11299841.
10. Kaasinen E., Rintala E., Hellstrom P. et al. Factors explaining recurrence in patients undergoing chemoimmunotherapy regimens for frequently recurring superficial bladder carcinoma. *Eur Urol* 2002;42(2):167–74. PMID: 12160589.
11. Morales A., Eiding D., Bruce A.W. Intracavitary Bacillus Calmette–Guerin in the treatment of superficial bladder tumors. *J Urol* 2017;197(2S):S142–5. DOI: 10.1016/j.juro.2016.10.101. PMID: 28012770.
12. Fuge O., Vasdev N., Allchorne P., Green J.S. Immunotherapy for bladder cancer. *Res Rep Urol* 2015;7:65–79. DOI: 10.2147/RRU.S63447. PMID: 26000263.
13. Malmstrom P.U., Sylvester R.J., Crawford D.E. et al. An individual patient data meta-analysis of the long-term outcome of randomised studies comparing intravesical mitomycin C versus bacillus Calmette–Guerin for non-muscle-invasive bladder cancer. *Eur Urol* 2009;56(2):247–56. DOI: 10.1016/j.eururo.2009.04.038. PMID: 19409692.
14. Bohle A., Bock P.R. Intravesical bacille Calmette–Guerin versus mitomycin C in superficial bladder cancer: formal meta-analysis of comparative studies on tumor progression. *Urology* 2004;63(4):682–6. PMID: 15072879.
15. Гладков О.А., Матвеев В.Б., Митин Т. и др. Практические рекомендации по лекарственному лечению рака мочевого пузыря. Злокачественные опухоли: Практические рекомендации RUSSCO 2017;7:411–20. DOI: 10.18027/2224-5057-2017-7-3s2-411-420. [Gladkov O.A., Matveev V.B., Mitin T. et al. Practical recommendations for the drug treatment of bladder cancer. Malignant tumors: Practical recommendations RUSSCO 2017;7:411–20. (In Russ.)].
16. Берников А.Н., Волкова М.И., Корякин О.Б. и др. Рак мочевого пузыря: клинические рекомендации. Научный совет Минздрава России, 2017, 57 с. ID: KP11. [Bernikov A.N., Volkova M.I., Koryakin O.B. et al. Bladder cancer: clinical guidelines. Scientific Council of the Ministry of Health of Russia, 2017, 57 p. (In Russ.)].
17. Brausi M., Oddens J., Sylvester R. et al. Side effects of Bacillus Calmette–Guerin (BCG) in the treatment of intermediate- and high-risk Ta, T1 papillary carcinoma of the bladder: results of the EORTC genito-urinary cancers group randomised phase 3 study comparing one-third dose with full dose and 1 year with 3 years of maintenance BCG. *Eur Urol* 2014;65(1):69–76. DOI: 10.1016/j.euro-uro.2013.07.021. PMID: 23910233.
18. Redelman-Sidi G., Glickman M.S., Bochner B.H. The mechanism of action of BCG therapy for bladder cancer – a current perspective. *Nat Rev Urol* 2014;11(3):153–62. DOI: 10.1038/nrurol.2014.15. PMID: 24492433.
19. Pettenati C., Ingersoll M.A. Mechanisms of BCG immunotherapy and its outlook for bladder cancer. *Nat Rev Urol* 2018;15(10):615–25. DOI: 10.1038/s41585-018-0055-4. PMID: 29991725.
20. Лелявин К.Б., Дворниченко В.В. Внутрипузырная иммунотерапия вакциной BCG в комплексном лечении немешечно-инвазивного рака мочевого пузыря. *Сибирский медицинский журнал*

- 2010;(4):5–8. Russian. [Lelyavin K.B., Dvornichenko V.V. Intravesical immunotherapy with vaccine BCG in complex treatment of non-muscle-invasive bladder cancer. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal = Siberian Medical Journal* 2010;(4):5–8. (In Russ.)].
21. Saluja M., Gilling P. Intravesical bacillus Calmette–Guerin instillation in non-muscle-invasive bladder cancer: a review. *Int J Urol* 2018;25(1):18–24. DOI: 10.1111/iju.13410. PMID: 28741703.
 22. Maruf M., Brancato S.J., Agarwal P.K. Nonmuscle invasive bladder cancer: a primer on immunotherapy. *Cancer Biol Med* 2016;13(2):194–205. DOI: 10.20892/j.issn.2095-3941.2016.0020. PMID: 27458527.
 23. Wu C., Zhou X., Miao C. et al. Assessing the feasibility of replacing standard-dose Bacillus Calmette–Guerin immunotherapy with other intravesical instillation therapies in bladder cancer patients: a network meta-analysis. *Cell Physiol Biochem* 2017;41(4):1298–312. DOI: 10.1159/000464432. PMID: 28278504.
 24. Patel S.G., Cohen A., Weiner A.B., Steinberg G.D. Intravesical therapy for bladder cancer. *Expert Opin Pharmacother* 2015;16(6):889–901. DOI: 10.1517/14656566.2015.1024656. PMID: 25773220.
 25. Deng X., Zhang X., Cheng Y. et al. XRCC1 polymorphisms associated with survival among Chinese bladder cancer patients receiving epirubicin and mitomycin C. *Tumour Biol* 2015;36(6):4591–96. DOI: 10.1007/s13277-015-3104-0. PMID: 25616696.
 26. Deng X., Yang X., Cheng Y. et al. GSTP1 and GSTO1 single nucleotide polymorphisms and the response of bladder cancer patients to intravesical chemotherapy. DOI: 10.1038/srep14000. PMID: 26354850.
 27. Mittal R.D. Gene variants in predicting BCG response to urinary bladder cancer. *Indian J Clin Biochem* 2012;27(1):1–5. DOI: 10.1007/s12291-012-0191-1. PMID: 23277706.
 28. Buffen K., Oosting M., Quintin J. et al. Autophagy controls BCG-induced trained immunity and the response to intravesical BCG therapy for bladder cancer. *PLoS Pathog* 2014;10(10):e1004485. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004485. PMID: 25356988.
 29. Williams S.B., Kamat A.M., Mmeje C. et al. Genetic variants in the inflammation pathway as predictors of recurrence and progression in non-muscle invasive bladder cancer treated with Bacillus Calmette–Guerin. *Oncotarget* 2017;8(51):88782–91. DOI: 10.18632/oncotarget.21222. PMID: 29179475.
 30. Grotenhuis A.J., Dudek A.M., Verhaegh G.W. et al. Independent replication of published germline polymorphisms associated with urinary bladder cancer prognosis and treatment response. *Bladder Cancer* 2016;2(1):77–89. PMID: 27376129.
 31. Lima L., Ferreira J.A., Tavares A. et al. FASL polymorphism is associated with response to bacillus Calmette–Guerin immunotherapy in bladder cancer. *Urol Oncol* 2014;32(1):44.e1–7. DOI: 10.1016/j.urolonc.2013.05.009. PMID: 23948181.
 32. Ke H.L., Lin J., Ye Y. et al. Genetic variation in glutathione pathway genes predict cancer recurrence in patients treated with transurethral resection and Bacillus Calmette–Guerin instillation for non-muscle invasive bladder cancer. *Ann Surg Oncol* 2015;22(12):4104–10. DOI: 10.1245/s10434-015-4431-5. PMID: 25851338.
 33. Kang H.W., Tchey D.U., Yan C. et al. The predictive value of GSTT1 polymorphisms in predicting the early response to induction BCG therapy in patients with non-muscle invasive bladder cancer. *Urol Oncol* 2014;32(4):458–65. DOI: 10.1016/j.urolonc.2013.10.013. PMID: 24411789.
 34. Lima L., Oliveira D., Ferreira J.A. et al. The role of functional polymorphisms in immune response genes as biomarkers of bacilli Calmette–Guerin (BCG) immunotherapy outcome in bladder cancer: establishment of a predictive profile in a Southern Europe population. *BJU Int* 2015;116(5):753–63. DOI: 10.1111/bju.12844. PMID: 24931268.
 35. Zhang N., Jiang G., Liu X. et al. Prediction of Bacillus Calmette–Guerin response in patients with bladder cancer after transurethral resection of bladder tumor by using genetic variation based on genomic studies. *Biomed Res Int* 2016;2016:9859021. DOI: 10.1155/2016/9859021. PMID: 27896277.
 36. Ryk C., Koskela L.R., Thiel T. et al. Outcome after BCG treatment for urinary bladder cancer may be influenced by polymorphisms in the NOS2 and NOS3 genes. *Redox Biol* 2015;6:272–7. DOI: 10.1016/j.redox.2015.08.008. PMID: 26298202.
 37. Chiong E., Kesavan A., Mahendran R. et al. NRAMP1 and hGPX1 gene polymorphism and response to Bacillus Calmette–Guerin therapy for bladder cancer. *Eur Urol* 2011;59(3):430–7. DOI: 10.1016/j.eururo.2010.11.031. PMID: 21163569.
 38. Lenormand C., Couteau J., Nouhaud F.X. et al. Predictive value of NRAMP1 and HGPX1 gene polymorphism for maintenance BCG response in non-muscle-invasive bladder cancer. *Anticancer Res* 2016;36(4):1737–43. PMID: 27069153.
 39. Wei H., Kamat A., Chen M. et al. Association of polymorphisms in oxidative stress genes with clinical outcomes for bladder cancer treated with Bacillus Calmette–Guerin. *PLoS One* 2012;7(6):e38533. DOI: 10.1371/journal.pone.0038533. PMID: 22701660.
 40. Kandimalla R., van Tilborg A.A., Zwarthoff E.C. DNA methylation-based biomarkers in bladder cancer. *Nat Rev Urol* 2013;10(6):327–35. DOI: 10.1038/nrurol.2013.89. PMID: 23628807.
 41. Agundez M., Grau L., Palou J. et al. Evaluation of the methylation status of tumour suppressor genes for predicting Bacillus Calmette–Guerin response in patients with T1G3 high-risk bladder tumours. *Eur Urol* 2011;60(1):131–40. DOI: 10.1016/j.eururo.2011.04.020. PMID: 21514719.
 42. Husek P., Pacovsky J., Chmelarova M. et al. Methylation status as a predictor of intravesical Bacillus Calmette–Guerin (BCG) immunotherapy response of high grade non-muscle invasive bladder tumor. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2017;161(2):210–6. DOI: 10.5507/bp.2017.008. PMID: 28344356.
 43. Zuiverloon T.C., Nieuweboer A.J., Vekony H. et al. Markers predicting response to bacillus Calmette–Guerin immunotherapy in high-risk bladder cancer patients: a systematic review. *Eur Urol* 2012;61(1):128–45. DOI: 10.1016/j.eururo.2011.09.026. PMID: 22000498.
 44. Poli G., Cochetti G., Boni A. et al. Characterization of inflammation-related genes in urine sediments of patients receiving intravesical BCG therapy. *Urol Oncol* 2017;35(12):674.e19–24. DOI: 10.1016/j.urolonc.2017.08.004. PMID: 28888400.
 45. Rahmat J.N., Esuvaranathan K., Mahendran R. Bacillus Calmette–Guerin induces rapid gene expression changes in human bladder cancer cell lines that may modulate its survival. *Oncol Lett* 2018;15(6):9231–41. DOI: 10.3892/ol.2018.8462. PMID: 29844825.
 46. Mano R., Zilber S., Di Natale R.G. et al. Heat shock proteins 60 and 70 are associated with long-term outcome of T1-stage high-grade urothelial tumors of the bladder treated with intravesical Bacillus Calmette–Guerin immunotherapy. *Urol Oncol* 2018;36(12):531.e9–17. DOI: 10.1016/j.urolonc.2018.09.007. PMID: 30337218.
 47. He Y., Wang N., Zhou X. et al. Prognostic value of ki67 in BCG-treated non-muscle invasive bladder cancer: a meta-analysis and systematic review. *BMJ Open* 2018;8(4):e019635. DOI: 10.1136/bmjopen-2017-019635. PMID: 29666128.
 48. Wang C., Li A., Yang S. et al. CXCL5 promotes mitomycin C resistance in non-muscle invasive bladder cancer by activating EMT and NF- κ B pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2018;498(4):862–8. DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.03.071. PMID: 29545183.
 49. Xu T., Qin L., Zhu Z. et al. MicroRNA-31 functions as a tumor suppressor and in-

- creases sensitivity to mitomycin-C in urothelial bladder cancer by targeting integrin $\alpha 5$. *Oncotarget* 2016;7(19):27445–57. DOI: 10.18632/oncotarget.8479. PMID: 27050274.
50. Kamat A.M., Li R., O'Donnell M.A. et al. Predicting response to intravesical Bacillus Calmette-Guerin immunotherapy: are we there yet? A systematic review. *Eur Urol* 2018;73(5):738–48. DOI: 10.1016/j.eururo.2017.10.003. PMID: 29055653.
 51. Sanguedolce F., Cormio A., Massenio P. et al. Altered expression of HER-2 and the mismatch repair genes MLH1 and MSH2 predicts the outcome of T1 high-grade bladder cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2018;144(4):637–44. DOI: 10.1007/s00432-018-2593-9. PMID: 29362915.
 52. Abbosh P.H., Plimack E.R. Molecular and clinical insights into the role and significance of mutated DNA repair genes in bladder cancer. *Bladder Cancer* 2018;4(1):9–18. DOI: 10.3233/BLC-170129. PMID: 29430503.
 53. Mouw K.W. DNA repair pathway alterations in bladder cancer. *Cancers (Basel)* 2017;9(4):E28. DOI: 10.3390/cancers9040028. PMID: 28346378.
 54. Liem E.I., Baard J., Cauberg E.C. et al. Fluorescence in situ hybridization as prognostic predictor of tumor recurrence during treatment with Bacillus Calmette–Guerin therapy for intermediate- and high-risk non-muscle-invasive bladder cancer. *Med Oncol* 2017;34(10):172. DOI: 10.1007/s12032-017-1033-z. PMID: 28866819.
 55. Grivas P.D., Melas M., Papavassiliou A.G. The biological complexity of urothelial carcinoma: insights into carcinogenesis, targets and biomarkers of response to therapeutic approaches. *Semin Cancer Biol* 2015;35:125–32. DOI: 10.1016/j.semcancer.2015.08.006. PMID: 26304731.
 56. Михайленко Д.С., Немцова М.В. Точковые соматические мутации в развитии рака мочевого пузыря: ключевые события канцерогенеза, диагностические маркеры и мишени для терапии. *Урология* 2016;(1):100–5. Russian [Mikhailenko D.S., Nemtsova M.V. Point somatic mutations in bladder cancer: key carcinogenesis events, diagnostic markers and therapeutic targets. *Urologiya = Urology* 2016;(1):100–5. (In Russ.)].
 57. Ren R., Tyryshkin K., Graham C.H. et al. Comprehensive immune transcriptomic analysis in bladder cancer reveals subtype specific immune gene expression patterns of prognostic relevance. *Oncotarget* 2017;8(41):70982–1001. DOI: 10.18632/oncotarget.20237. PMID: 29050337.
 58. Meeks J.J., Carneiro B.A., Pai S.G. et al. Genomic characterization of high-risk non-muscle invasive bladder cancer. *Oncotarget* 2016;7(46):75176–84. DOI: 10.18632/oncotarget.12661. PMID: 27750214.
 59. Pietzak E.J., Bagrodia A., Cha E.K. et al. Next-generation sequencing of nonmuscle invasive bladder cancer reveals potential biomarkers and rational therapeutic targets. *Eur Urol* 2017;72(6):952–9. DOI: 10.1016/j.eururo.2017.05.032. PMID: 28583311.
 60. Pang K.H., Esperto F., Noon A.P. et al. Opportunities of next-generation sequencing in non-muscle invasive bladder cancer outcome prediction. *Transl Androl Urol* 2017;6(6):1043–8. DOI: 10.21037/tau.2017.10.04. PMID: 29354491.
 61. Scott S.N., Ostrovskaya I., Lin C.M. et al. Next-generation sequencing of urine specimens: a novel platform for genomic analysis in patients with non-muscle-invasive urothelial carcinoma treated with bacille Calmette–Guerin. *Cancer Cytopathol* 2017;125(6):416–26. DOI: 10.1002/cncy.21847. PMID: 28339163.
 62. Волкова М.И., Гриднева Я.В., Ольшанская А.С. Иммунотерапия уротелиального рака: реалии и перспективы. *Онкоурология* 2017;13(4):16–24. DOI: 10.17650/1726-9776-2017-13-4-16-24. [Volkova M.I., Gridneva Ya.V., Ol'shanskaya A.S. Immunotherapy in urothelial cancer: recent data and perspectives. *Onkourologiya = Cancer Urology* 2017;13(4):16–24. (In Russ.)].
 63. Dietrich B., Srinivas S. Urothelial carcinoma: the evolving landscape of immunotherapy for patients with advanced disease. *Res Rep Urol* 2018;10:7–16. DOI: 10.2147/RRU.S125635. PMID: 29417045.
 64. Горелов А.И., Симбирцев А.С., Журавский Д.А., Горелова А.А. Ингибиторы PD-1/PD-L1 в лечении рака мочевого пузыря: от медиатора иммунного ответа к таргетной терапии. *Урологические ведомости* 2018;8(2):64–72. DOI: 10.17816/uroved8264-72. [Gorelov A.I., Simbirtsev A.S., Zhuravskiy D.A., Gorelova A.A. A review of the PD-1/PD-11 checkpoint in bladder cancer: from mediator of immune escape to target for treatment. *Urologicheskie vedomosti = Urological Statements* 2018;8(2):64–72. (In Russ.)].
 65. Huang Y., Zhang S.D., McCrudden C. et al. The prognostic significance of PD-L1 in bladder cancer. *Oncol Rep* 2015;33(6):3075–84. DOI: 10.3892/or.2015.3933. PMID: 25963805.
 66. Chang L., Chang M., Chang H.M., Chang F. Microsatellite instability: a predictive biomarker for cancer immunotherapy. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2018;26(2):e15–21. DOI: 10.1097/PAI.0000000000000575. PMID: 28877075.
 67. Aggen D.H., Drake C.G. Biomarkers for immunotherapy in bladder cancer: a moving target. *J Immunother Cancer* 2017;5(1):94. DOI: 10.1186/s40425-017-0299-1. PMID: 29157296.
 68. Kim H.S., Seo H.K. Immune checkpoint inhibitors for urothelial carcinoma. *Investig Clin Urol* 2018;59(5):285–96. DOI: 10.4111/icu.2018.59.5.285. PMID: 30182073.
 69. Felsenstein K.M., Theodorescu D. Precision medicine for urothelial bladder cancer: update on tumour genomics and immunotherapy. *Nat Rev Urol* 2018;15(2):92–111. DOI: 10.1038/nrurol.2017.179. PMID: 29133939.
 70. Wezel F., Vallo S., Roghmann F. et al. Do we have biomarkers to predict response to neoadjuvant and adjuvant chemotherapy and immunotherapy in bladder cancer? *Transl Androl Urol* 2017;6(6):1067–80. DOI: 10.21037/tau.2017.09.18. PMID: 29354494.
 71. Udall M., Rizzo M., Kenny J. et al. PD-L1 diagnostic tests: a systematic literature review of scoring algorithms and test-validation metrics. *Diagn Pathol* 2018;13(1):12. DOI: 10.1186/s13000-018-0689-9. PMID: 29426340.
 72. Hashizume A., Umemoto S., Yokose T. et al. Enhanced expression of PD-L1 in non-muscle-invasive bladder cancer after treatment with Bacillus Calmette–Guerin. *Oncotarget* 2018;9(75):34066–78. DOI: 10.18632/oncotarget.26122. PMID: 30344922.
 73. Wang Y., Liu J., Yang X. et al. Bacillus Calmette–Guerin and anti-PD-L1 combination therapy boosts immune response against bladder cancer. *Onco Targets Ther* 2018;11:2891–9. DOI: 10.2147/OTT.S165840. PMID: 29844686.
 74. Stenehjem D.D., Tran D., Nkrumah M.A., Gupta S. PD1/PDL1 inhibitors for the treatment of advanced urothelial bladder cancer. *Onco Targets Ther* 2018;11:5973–89. DOI: 10.2147/OTT.S135157. PMID: 30275703.
 75. Rouanne M., Roumiguie M., Houede N. et al. Development of immunotherapy in bladder cancer: present and future on targeting PD(L)1 and CTLA-4 pathways. *World J Urol* 2018;36(11):1727–40. DOI: 10.1007/s00345-018-2332-5. PMID: 29855698.

Вклад авторов

Д.С. Михайленко: обзор литературы по всем разделам, написание большинства разделов статьи, составление плана обзора;
С.А. Сергиенко: написание раздела про метилирование и экспрессионные маркеры рака мочевого пузыря;
И.Н. Заборский: обзор публикаций по существующим прогностическим маркерам рака мочевого пузыря;
К.Н. Сафиуллин: написание раздела про адьювантную иммунотерапию рака мочевого пузыря;
С.А. Серебряный: подготовка таблиц и рисунка в обзоре;
Н.Ю. Сафронова: подготовка финальной версии рукописи перед публикацией;
М.В. Немцова: написание вводной части обзора;
А.Д. Каприн: составление общего плана статьи;
Б.Я. Алексеев: разработка дизайна обзора и его частей.

Authors' contributions

D.S. Mikhaylenko: literature review for all sections, writing of most of the article sections, drafting of the review plan;
S.A. Sergienko: writing of the section on bladder cancer methylation and expression markers;
I.N. Zaborsky: review of the literature on existing prognostic markers for bladder cancer;
K.N. Safiullin: writing of the section on bladder cancer adjuvant immunotherapy;
S.A. Serebryany: making the review tables and figure;
N.Yu. Safronova: preparation of the final draft of the manuscript for publication;
M.V. Nemtsova: writing of the introductory section of the review;
A.D. Kaprin: drafting of the general plan of the article;
B.Ya. Alekseev: development of the design of the review and its parts.

ORCID авторов/ORCID of authors

Д.С. Михайленко/D.S. Mikhaylenko: <https://orcid.org/0000-0001-9780-8708>
И.Н. Заборский/I.N. Zaborsky: <https://orcid.org/0000-0001-5988-8268>
М.В. Немцова/M.V. Nemtsova: <https://orcid.org/0000-0002-2835-5992>
А.Д. Каприн/A.D. Kaprin: <https://orcid.org/0000-0001-8784-8415>
Б.Я. Алексеев/B.Ya. Alekseev: <https://orcid.org/0000-0002-3398-4128>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.
Financing. The study was performed without external funding.